

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle**  
Bureau international



**(43) Date de la publication internationale**  
11 août 2005 (11.08.2005)

**PCT**

**(10) Numéro de publication internationale**  
**WO 2005/073364 A3**

**(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :**  
**C12N 15/01**, 9/02, 1/21, C12P 7/18, 7/28

**(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) :** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**(21) Numéro de la demande internationale :**  
PCT/FR2005/000070

**(22) Date de dépôt international :**  
12 janvier 2005 (12.01.2005)

**(25) Langue de dépôt :** français

**(26) Langue de publication :** français

**(30) Données relatives à la priorité :**  
0400214 12 janvier 2004 (12.01.2004) FR

**(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :**  
**METABOLIC EXPLORER [FR/FR]**; Biopôle Clermont-Limagne, F-63360 Saint Beauzire (FR).

**(72) Inventeurs; et**

**(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :** **MEYNIAL-SALLES, Isabelle [FR/FR]**; 15, chemin Montroux, F-31450 Fourquevaux (FR). **GONZALEZ, Benjamin [FR/FR]**; 15, rue de l'Horloge, F-63200 Riom (FR). **SOUCAILLE, Philippe [FR/FR]**; Chant Du Coucou, F-31450 Deyme (FR).

**(74) Mandataires :** **MARTIN, Jean-Jacques** etc.; Cabinet Regimbeau, 129, rue Servient, F-69326 Lyon Cedex 03 (FR).

**(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) :** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Déclaration en vertu de la règle 4.17 :**

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

**Publiée :**

— avec rapport de recherche internationale  
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

**(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:** 29 septembre 2005

*[Suite sur la page suivante]*

**(54) Title:** ADVANCED MICROORGANISM FOR PRODUCING 1,2-PROPANEDIOL

**(54) Titre :** MICROORGANISME EVOLUÉ POUR LA PRODUCTION DE 1,2-PROPANEDIOL

**(57) Abstract:** The invention relates to a novel method for preparing an advanced microorganism strain for producing 1,2-propanediol by the metabolism of a simple carbon source consisting in preparing a culture under pressure selected in an appropriate culture medium which comprises a simple carbon source, an initial bacterial strain containing a *tpiA* gene deletion and the deletion of at least one gene involved in a glyoxal methyl (propanal) conversion into lactate in order to develop in said initial strain one or several genes involved in a biosynthesis of DHPA into methylglyoxal and, afterwards into 1,2-propanediol towards advanced genes exhibiting an improved 1,2-propanediol synthase activity and in subsequently selecting the strain(s) of advanced microorganisms exhibiting said improved 1,2-propanediol synthase activity. The initial microorganisms, thus obtained advanced microorganisms and a method for preparing 1,2-propanediol and possibly acetone by the advanced microorganisms culture are also disclosed.

**(57) Abrégé :** La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation d'une souche de microorganismes évolués pour la production de 1,2-propanediol par métabolisme d'une source de carbone simple, ledit procédé comprenant la culture sous pression de sélection dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple, d'une souche bactérienne initiale comprenant une délétion du gène *tpiA* et une délétion d'au moins un gène impliqué dans la conversion du méthyl glyoxal (propanal) en lactate, afin de faire évoluer dans ladite souche initiale un ou plusieurs gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du DHAP en méthylglyoxal puis en 1,2-propanediol vers des gènes évolués ayant une activité « 1,2-propanediol synthase » améliorée, puis on sélectionne et on isole la ou les souches de microorganismes évolués ayant une activité « 1,2propanediol synthase » améliorée. L'invention concerne également les microorganismes initiaux et les microorganismes évolués ainsi obtenus et un procédé de préparation de 1,2-propanediol et éventuellement d'acétone par culture des microorganismes évolués.

**WO 2005/073364 A3**



*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2005/000070A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/01 C12N9/02 C12N1/21 C12P7/18 C12P7/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, FSTA, CHEM ABS Data, Sequence Search

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category <sup>a</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/37204 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 27 August 1998 (1998-08-27) cited in the application	1-3, 5, 7-9, 13-16, 18, 20
A	the whole document	4, 6, 10-12, 17, 19
A	----- ALTARAS NEDIM E ET AL: "Metabolic engineering of a 1,2-Propanediol pathway in Escherichia coli" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 65, no. 3, March 1999 (1999-03), pages 1180-1185, XP002293970 ISSN: 0099-2240 cited in the application abstract; figure 2 page 1185, left-hand column -----	1-3, 5, 7-9, 13-16, 18, 20
	-----	

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

19 July 2005

28/07/2005

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Devijver, K

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2005/000070

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALTARAS NEDIM E ET AL: "Enhanced production of (R)-1,2-propanediol by metabolically engineered <i>Escherichia coli</i> " BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 16, no. 6, November 2000 (2000-11), pages 940-946, XP002293971 ISSN: 8756-7938 cited in the application the whole document -----	1-20
A	GIRBAL L ET AL: "Regulation of solvent production in <i>Clostridium acetobutylicum</i> " TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 16, no. 1, 1998, pages 11-16, XP004101891 ISSN: 0167-7799 the whole document -----	10-14, 16,18-20
A	CAMERON D C ET AL: "METABOLIC ENGINEERING OF PROPANEDIOL PATHWAYS" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, XX, XX, vol. 14, no. 1, 6 February 1998 (1998-02-06), pages 116-125, XP002067772 ISSN: 8756-7938 cited in the application page 122, right-hand column - page 123, left-hand column -----	1-20
A	TRAN-DIN K ET AL: "FORMATION OF D(-)-1,2-PROPANEDIOL AND D(-)-LACTATE FROM GLUCOSE BY CLOSTRIDIUM SPHENOIDES UNDER PHOSPHATE LIMITATION" ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, BERLIN, DE, vol. 142, 1985, pages 87-92, XP002067777 ISSN: 0302-8933 cited in the application page 91, left-hand column -----	1-20
A	SNOEP JACKY L ET AL: "Differences in sensitivity to NADH of purified pyruvate dehydrogenase complexes of <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> and <i>Escherichia coli</i> : Implications for their activity in vivo" FEMS (FEDERATION OF EUROPEAN MICROBIOLOGICAL SOCIETIES) MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 114, no. 3, 1993, pages 279-283, XP002293972 ISSN: 0378-1097 cited in the application the whole document -----	5-9

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2005/000070

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>STEPHENS P E ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE LIPOAMIDE DEHYDROGENASE GENE OF ESCHERICHIA COLI K12" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 135, no. 3, 1983, pages 519-528, XP008014488 ISSN: 0014-2956 the whole document -&amp; DATABASE UniProt 'Online' 21 July 1986 (1986-07-21), "Dihydrolipoyl dehydrogenase (EC 1.8.1.4) (E3 component of pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenases complexes) (Dihydrolipoamide dehydrogenase) (Glycine cleavage system L protein)." XP002334993 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:DLDH_ECOLI Database accession no. P00391 the whole document</p> <p>-----</p>	15-17

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/000070

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9837204	A 27-08-1998	US	6087140 A	11-07-2000
		AU	6331998 A	09-09-1998
		CA	2281001 A1	27-08-1998
		EP	0972049 A1	19-01-2000
		WO	9837204 A1	27-08-1998
		WO	9928481 A1	10-06-1999
		US	6303352 B1	16-10-2001

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Demande internationale No

PCT/FR2005/000070

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE	CIB 7	C12N15/01	C12N9/02	C12N1/21	C12P7/18	C12P7/28
--	-------	-----------	----------	----------	----------	----------

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, FSTA, CHEM ABS Data, Sequence Search

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98/37204 A (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 27 août 1998 (1998-08-27) cité dans la demande	1-3, 5, 7-9, 13-16, 18, 20
A	le document en entier	4, 6, 10-12, 17, 19
A	----- ALTARAS NEDIM E ET AL: "Metabolic engineering of a 1,2-Propanediol pathway in <i>Escherichia coli</i> " APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 65, no. 3, mars 1999 (1999-03), pages 1180-1185, XP002293970 ISSN: 0099-2240 cité dans la demande abrégé; figure 2 page 1185, colonne de gauche -----	1-3, 5, 7-9, 13-16, 18, 20

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- °A° document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- °E° document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- °L° document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- °O° document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- °P° document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- °T° document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- °X° document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- °Y° document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- °&° document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 juillet 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/07/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Devijver, K

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR2005/000070

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	ALTARAS NEDIM E ET AL: "Enhanced production of (R)-1,2-propanediol by metabolically engineered <i>Escherichia coli</i> " BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 16, no. 6, novembre 2000 (2000-11), pages 940-946, XP002293971 ISSN: 8756-7938 cité dans la demande le document en entier -----	1-20
A	GIRBAL L ET AL: "Regulation of solvent production in <i>Clostridium acetobutylicum</i> " TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 16, no. 1, 1998, pages 11-16, XP004101891 ISSN: 0167-7799 le document en entier -----	10-14, 16,18-20
A	CAMERON D C ET AL: "METABOLIC ENGINEERING OF PROPANEDIOL PATHWAYS" BIOTECHNOLOGY PROGRESS, XX, XX, vol. 14, no. 1, 6 février 1998 (1998-02-06), pages 116-125, XP002067772 ISSN: 8756-7938 cité dans la demande page 122, colonne de droite - page 123, colonne de gauche -----	1-20
A	TRAN-DIN K ET AL: "FORMATION OF D(-)-1,2-PROPANEDIOL AND D(-)-LACTATE FROM GLUCOSE BY CLOSTRIDIUM SPHENOIDES UNDER PHOSPHATE LIMITATION" ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, BERLIN, DE, vol. 142, 1985, pages 87-92, XP002067777 ISSN: 0302-8933 cité dans la demande page 91, colonne de gauche -----	1-20
A	SNOEP JACKY L ET AL: "Differences in sensitivity to NADH of purified pyruvate dehydrogenase complexes of <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> and <i>Escherichia coli</i> : Implications for their activity in vivo" FEMS (FEDERATION OF EUROPEAN MICROBIOLOGICAL SOCIETIES) MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 114, no. 3, 1993, pages 279-283, XP002293972 ISSN: 0378-1097 cité dans la demande le document en entier -----	5-9
		-/-

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>STEPHENS P E ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE LIPOAMIDE DEHYDROGENASE GENE OF ESCHERICHIA COLI K12"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 135, no. 3, 1983, pages 519-528, XP008014488</p> <p>ISSN: 0014-2956</p> <p>1e document en entier</p> <p>-&amp; DATABASE UniProt 'Online!' 21 juillet 1986 (1986-07-21), "Dihydrolipoyl dehydrogenase (EC 1.8.1.4) (E3 component of pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenases complexes) (Dihydrolipoamide dehydrogenase) (Glycine cleavage system L protein)." XP002334993</p> <p>extrait de EBI accession no. UNIPROT:DLDH_ECOLI</p> <p>Database accession no. P00391</p> <p>1e document en entier</p> <p>-----</p>	15-17

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2005/000070

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
WO 9837204	A 27-08-1998	US AU CA EP WO WO	6087140 A 6331998 A 2281001 A1 0972049 A1 9837204 A1 9928481 A1		11-07-2000 09-09-1998 27-08-1998 19-01-2000 27-08-1998 10-06-1999
		US	6303352 B1		16-10-2001